1958

PHYTOPATHOLOGISCH LABORATORIUM

„WILLIE COMMELIN SCHOLTEN"

BAARN

MEDEDELING No. 23

DE MICROFLORA OP HET BLAD VAN BETA VULGARIS L.

With a summary:

The microflora on the leaf of Beta vulgaris L.

DOOR

L. C. P. KERLING

OVERDRUK UIT: TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN 64:402–410, 1958

DE MICROFLORA OP HET BLAD VAN *BETA VULGARIS*

T. Pl.ziekten 64 (1958): 402–410

DE MICROFLORA OP HET BLAD VAN *BETA VULGARIS*[1, 2]

With a summary: The microflora on the leaf of Beta vulgaris

DOOR

L. C. P. KERLING

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten", Baarn

INLEIDING

Het begrip „fyllosfeer" werd ongeveer gelijktijdig in de literatuur ingevoerd door LAST (1955) en door RUINEN (1956), onafhankelijk van elkaar. LAST stelde een onderzoek in naar de wijze van ontwikkeling van *Sporobolomyces roseus* KLUYVER et VAN NIEL, een gist, die in grote aantallen in de lucht en ook op bladeren kan voorkomen. Hij bracht de gist van jongere en oudere bladeren van tarwe en gerst in reincultuur en berekende uit het verkregen aantal kolonies de dichtheid van de gistpopulatie op het bladoppervlak. Het aantal kolonies nam toe bij het ouder worden van het blad en bereikte een maximum na de dood daarvan. Ook steeg het aantal kolonies met toenemende relatieve vochtigheid en temperatuur. LAST stelde voor, de naaste omgeving van het bladoppervlak, waarin zich deze flora ontwikkelt, met de naam „fyllosfeer" aan te duiden, in analogie met de „rhizosfeer", de omgeving van de wortel, waarin eveneens een „niet-parasitaire, hoog ontwikkelde flora" te vinden is. LAST kon geen relatie vaststellen tussen *Sporobolomyces* en het blad.

RUINEN onderzocht populaties van microörganismen, levend op bladeren van tropische planten, waarbij zij tot de ontdekking kwam, dat de bacteriën en gisten, die deel van de epifytische flora uitmaken, tot een klein aantal soorten behoren. Zij veronderstelde een betrekking tussen het blad en een *Beyerinckia* spec., een stikstof-bindende bacterie, oorspronkelijk als bewoner van tropische gronden bekend (DERX, 1950): enerzijds zouden de stoffen, die via de cuticula door het blad worden uitgescheiden een goede voedingsbodem voor de bacterie vormen, anderzijds zou het blad profiteren van de vastgelegde stikstof. Op grond van de nauwe relatie, die tussen de bewoners en het blad zou bestaan, duidt RUINEN dit typische milieu eveneens met de naam „fyllosfeer" aan.

Naast overeenkomst is er tussen de begrippen fyllosfeer en rhizosfeer toch ook wel een onderscheid op te merken. De bewoners van de fyllosfeer zijn beter te vergelijken met de epifytische flora levend op het worteloppervlak dan met de flora die zich ontwikkelt in de onmiddellijke nabijheid van de wortel, in de zone, die onder invloed van de wortelexcreten staat. Het is juist deze ruimte, buiten de wortel, die door GARRETT (1956) rhizosfeer genoemd wordt. Hoewel de term fyllosfeer hiermee niet geheel analoog is, bestaat er m.i. toch geen bezwaar met deze term de ruimte aan te geven onmiddellijk grenzend aan het bladoppervlak, waarop zich een epifytische vegetatie bevindt, levend in de invloedssfeer van het blad.

Behalve bij gisten en bacteriën zou men ook bij bladbewonende fungi een

[1] Aangenomen voor publikatie 8 augustus 1958.

[2] Aan het onderzoek werd meegewerkt door de Heer P. M. A. VAN ECK, biol. drs., Mej. L. P. M. TIMMERMANS en de Heren J. L. GEROLD en W. H. A. HEKKING, allen biol. cand.

betrekking tot het blad kunnen verwachten. Saprofyten zullen zich b.v. kunnen voeden met de exudaten er van. Dat bladeren stoffen uitscheiden is reeds lang bekend. Mes (1953) kon dit met moderne methoden opnieuw aantonen, terwijl volgens Will (1955) in regen, afstromend van naalden van *Pinus*-soorten, organische stoffen aanwezig waren. Brown (1922) en later Kovacs & Szeöcke (1956) vonden soms een stimulerende, soms een remmende invloed, uitgaande van exudaten op de ontkieming van schimmelsporen.

Om de betrekkingen van epifytische schimmels tot het blad te leren kennen, is het wenselijk tot een inventarisatie te komen, zoals dit o.a. geschied is door Rishbeth & Meredith (1957) voor de flora op dennenaalden. Eerst dan kan vastgesteld worden of de flora typisch is voor het onderzochte blad en wat de relatie tussen deze beide is. Het doel van dit voorlopig onderzoek was een inzicht te verkrijgen in de schimmelflora, die zich in de loop van een seizoen op een blad ontwikkelt en zo mogelijk van een enkele vertegenwoordiger de relatie tot het blad na te gaan.

MATERIAAL EN METHODIEK

Voor het onderzoek werd de voederbiet gekozen, *Beta vulgaris* L., in verband met een lopend onderzoek over het parasitisme van *Phoma betae*. De bladeren werden betrokken van een veld in Uden (N.B.), ver van bewoningen gelegen, beplant met het ras Jaapjes Groenkraag. De zaaitijd was eind april 1957. Het bietenperceel, op laag gelegen humeuze zandgrond, was ingesloten door een weiland en door velden, respectievelijk beplant met kool, stoppelknol en voederbiet. Van planten uit het midden van het veld werden steeds de buitenste bladeren verzameld, respectievelijk op 21 mei, 11 juni, 2 en 24 juli, 18 augustus, 8 september en 6 oktober 1957. De bladeren werden in plastic zakken verpakt en enkele uren later in het laboratorium te Baarn onderzocht. Op 21 mei waren de eerste bladeren juist groot genoeg om voor het onderzoek gebruikt te kunnen worden. Ook werden op 2 november 1956 bietebladeren (ras Klein Wanzleben) onderzocht, afkomstig uit de laboratoriumtuin, waarbij de flora respectievelijk aanwezig op een volwassen groen, een vergelend en een reeds verwelkt blad vergeleken werd.

De bladeren of bladgedeelten met bekend oppervlak werden eerst in een bekende hoeveelheid steriel water gedurende twee uren gespoeld, waarna telkens drie oogjes, eveneens met bekend volume, van het 1 : 2 of 1 : 4 verdunde spoelwater uitgestreken werden op een voedingsbodem in een petrischaal. Per serie werden meestal drie soorten voedingsbodems gebruikt: kersagar, aardappelagar en mout- of havermoutagar, telkens 10 schalen met dezelfde voedingsbodem. Er ontwikkelden zich kolonies van schimmels, gisten en bacteriën. Na telling werden de schimmels in reincultuur gebracht en gedetermineerd, evenals enkele van de meest voorkomende gistsoorten. Ook werd een gedeelte van de gespoelde bladstukjes op agar uitgelegd, nadat zij in deeltjes van 2 tot 4 mm^2 verdeeld waren, om de daarop aanwezige sporen zoveel mogelijk gelegenheid te geven afzonderlijke kolonies te vormen. Op deze wijze kwamen de schimmels te voorschijn, die hechter op het bladoppervlak gekleefd waren en door spoelen niet vrij gekomen waren, terwijl ook eventueel inwendig aanwezige schimmels konden uitgroeien. Tenslotte werd uit de tellingen het totaal aantal organismen aanwezig per cm^2 blad berekend.

Om na te gaan of er ook organismen in het inwendige van het blad aanwezig

waren, werd getracht oppervlakkig aanklevende sporen of mycelium te elimineren door de bladstukjes uitwendig te ontsmetten met 0,1 % sublimaatoplossing gedurende 1, 2 of 3 minuten. Een zeker resultaat valt op deze wijze echter niet te bereiken: indien zich geen organismen meer ontwikkelen na uitleggen op agar, kan men veronderstellen, dat er geen binnendringers waren. Het is echter ook mogelijk, dat men die door de ontsmetting gedood heeft. Omgekeerd mag men, wanneer er nog organismen na de ontsmetting te voorschijn komen, evenmin tot hun aanwezigheid in het blad besluiten: de ontsmetting kan te licht geweest zijn om alle epifyten te doden. Het aantal bacteriën en gisten, dat zich uit de alleen gespoelde en uit de ontsmette stukjes ontwikkelde, was echter zo klein, dat de schattingen van de aantallen per cm^2 blad, gebaseerd op de isolaties uit het spoelwater er niet door beïnvloed werden. Als voorbeeld van de berekening moge het volgende geval dienen: 1646 cm^2 blad werd in 520 cc water gespoeld. Het spoelwater werd vervolgens tot 1 : 4 met steriel water verdund. Hiervan werden 30 oogjes met een totaal volume van 0,18 cc op 10 schalen met aardappelagar uitgestreken. Er ontwikkelden zich o.a. 40 schimmelkolonies. Per cm^2 bevonden zich dus $\frac{4 \times 520}{0{,}18} \times 40 : 1646 = \pm 280$ schimmelsporen of stukjes mycelium. Deze waren over de boven- en onderkant van het blad verdeeld.

RESULTATEN

Op de zure kersagar ontwikkelde zich een groter aantal schimmelkolonies dan op de andere bodems, waarop de schimmelgroei vaak geremd werd door gisten en bacteriën. Ook werden soms andere soorten op kersagar dan op de niet-zure bodems aangetroffen, hetgeen waarschijnlijk op toeval berust zal hebben. In fig. 1 zijn de gemiddelde aantallen schimmelkolonies per cm^2 aangegeven, die zich op alle voedingsbodems ontwikkeld hadden, terwijl de gemiddelde aantallen gisten en bacteriën per cm^2 blad berekend zijn naar hun ontwikkeling op de niet zure bodems.

Reeds op 21 mei was het aantal gisten groot, waarna op 11 juni het aantal organismen plotseling zeer laag bleek te zijn. Dit moet waarschijnlijk toegeschreven worden aan het schoon spoelen der bladeren door langdurige zware regen, juist voor het plukken der bladeren gevallen. Op 2 juli werden veel bacteriën gevonden en ook was het aantal gisten weer toegenomen. De temperatuur, aan deze plukdatum voorafgaande, was abnormaal hoog geweest, met een maximum van 35°C. Gedurende augustus steeg het aantal organismen, waarschijnlijk onder invloed van de toenemende relatieve vochtigheid en de nog steeds vrij

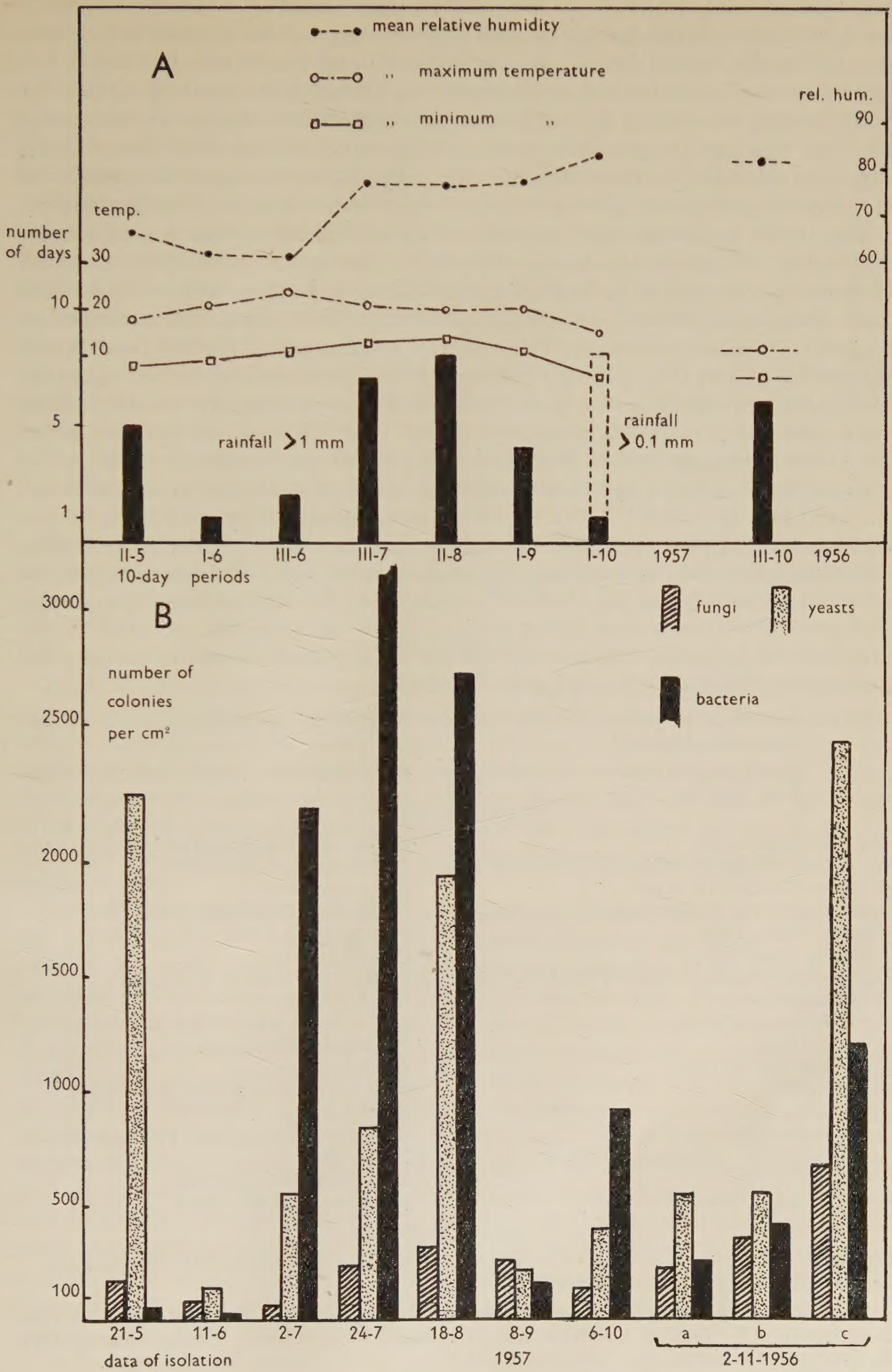
---

FIG. 1. A Gemiddelden van regenval, maximum- en minimumdagtemperaturen en relatieve vochtigheid over de decaden voorafgaande aan de datum, waarop onderzoek plaats vond of waarin dit geschiedde.

B Overzicht van het aantal schimmel-, gist- en bacteriekolonies geïsoleerd per cm^2 blad van de voederbiet, *Beta vulgaris*.
a: groen blad; b: vergelend blad; c: verwelkt blad

A *Mean rainfall, maximum and minimum temperatures and relative humidity of the periods of 10 days preceding the date of isolation or of the 10-day periods in which the isolations were carried out.*

B *The number of colonies of fungi, yeasts and bacteria isolated per* cm^2 *leaf blade of the fodder beet* Beta vulgaris.
a: *green leaf;* b: *yellowing leaf;* c: *wilted leaf*


A
mean relative humidity
,, maximum temperature
,, minimum ,,
rel. hum.
90
80
70
60
temp.
number of days
30
10
20
10
5
1
rainfall >1 mm
rainfall >0.1 mm
II-5
I-6
III-6
III-7
II-8
I-9
I-10
1957
III-10
1956
10-day periods
B
3000
2500
2000
1500
1000
500
100
number of colonies per cm²
fungi
yeasts
bacteria
21-5
11-6
2-7
24-7
18-8
8-9
6-10
a
b
c
data of isolation
1957
2-11-1956

hoge gemiddelde temperatuur. Het aantal organismen op de bladeren geplukt op 8 september bleek plotseling veel lager te liggen, terwijl toch in de eerste decade van die maand de relatieve vochtigheid hoog was en de temperatuur nog slechts weinig verschilde van die in augustus. Vermoedelijk was ook nu weer het blad grotendeels schoon gespoeld door vele regenbuien. Begin oktober trad er weer een stijging in het aantal kolonies op tijdens een periode met bijna elke dag een regenval variërend tussen 0,1 en 1 mm: niet zwaar genoeg om de organismen af te spoelen, maar wel voldoende om een hoge luchtvochtigheid te handhaven.

Het aantal organismen op de bladeren uit de laboratoriumtuin, geplukt op 2 november, varieerde met de ouderdom der bladeren: op de sterk verwelkte bladeren was het aantal beduidend groter dan op de jongere. Uit het spoelwater en de bladstukjes werden in totaal 721 schimmelkolonies geïsoleerd, behorend tot ongeveer 34 soorten (tabel 1). Vele isolaties konden echter niet tot fructificeren gebracht worden. 51 % van de schimmels bleek *Cladosporium herbarum* te zijn; 15,8 % was *Alternaria tenuis*. *C. herbarum* kwam gedurende het gehele seizoen voor, maar naar verhouding werden er later meer kolonies uit het blad geïsoleerd dan uit het spoelwater. Waarschijnlijk had het mycelium zich vaster op het bladoppervlak gehecht dan in het begin van het seizoen. Het aantal kolonies van *A. tenuis* liep op van 4,4 % van het totale aantal in augustus tot 28,8 % in september, waarbij deze schimmel eveneens een grotere affiniteit tot het blad ging vertonen. Misschien waren deze schimmels zelfs het blad binnengedrongen; na uitwendige ontsmetting van bladstukjes gedurende drie minuten had er in mei en juni geen schimmel-ontwikkeling plaats, terwijl de genoemde soorten in oktober na een dergelijke ontsmetting nog wel te voorschijn kwamen, tezamen met *Epicoccum-*, *Phoma-* en *Stemphylium*-soorten.

TABEL 1. Schimmel- en gistsoorten, geïsoleerd uit de fyllosfeer van bladeren van de voederbiet, *Beta vulgaris*[1].
Species of fungi and yeasts isolated from the phyllosphere of leaves of the fodderbeet, Beta vulgaris.

Schimmels/*Fungi*

Alternaria tenuis auct.	*P. diversum* RAPER et FENNELL
Aspergillus echinulatus (DELACR.) THOM et CHURCH	*P. meleagrinum* BIOURGE
A. repens (CORDA) DE BARY	*P. notatum* WESTL.
A. versicolor (VUILL.) TIRABOSCHI	*P. oxalicum* CURRIE et THOM
Botrytis cinerea PERS.	*P. spinulosum* THOM
Cephalosporium spec.	*P. tardum* THOM
Cladosporium cladosporioides (FRES.) DE VRIES	*Pestalozzia ramulose* V. BEYMA
C. herbarum LINK	*Phialophora* spec.
C. macrocarpum PREUSS	*Phoma betae* (OUD.) FRANK
Cytospora spec.	*P. herbarum* WESTEND.
Epicoccum nigrum LINK	*Phomopsis* spec.
Fusarium spec.	*Pullularia pullulans* (DE BARY) BERKH.
Gliomastix convoluta (HARZ) MASON	*Rhizoctonia* spec.
Isaria farinosa (DICKS.) FR.	*Stemphylium consortiale* (THÜM.) GROVES
Penicillium brevi-compactum DIERCKX	*Torula* spec. (et SKOLKO
P. citrinum THOM	*Trichoderma koningii* OUD.
P. corylophilum DIERCKX	*T. lignorum* (TODE) HARZ

Gisten/ *Yeasts*

Sporobolomyces roseus KLUYVER et VAN NIEL	*Cryptococcus laurentii* (KUFF.) SKINNER
Cryptococcus albidus (SAITO) SKINNER	

[1] Aan de medewerksters van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures onze dank voor de verleende hulp: Mej. A. C. STOLK was zo vriendelijk de Penicillia te determineren, Mej. W. CH. SLOOFF de gisten.

Van deze soorten is *Phoma betae* een bekende parasiet van de biet. De relatie van deze schimmel tot het bieteblad werd nu nader bestudeerd door bladeren van het ras „Klein Wanzleben" met een sporensuspensie van *Phoma betae* te inoculeren. In de maand juli, toen de maximumtemperatuur ongeveer 20 °C was, ontstonden er reeds na enkele dagen kleine vlekjes, die zich verder ontwikkelden tot 12 dagen na de inoculatie de typische *Phoma*-vlekken optraden, 2 tot 5 cm groot, met een necrotisch centrum en concentrische ringen. Pycnidiën waren aanwezig (fig. 2 en 3). Later in het seizoen verliep het infectieproces echter beduidend langzamer: na een inoculatie op 14 augustus waren de vlekjes na 14 dagen nog maar nauwelijks zichtbaar. De maximale dagtemperatuur was in die periode 17 °C. De schimmel was wel binnengedrongen, want na desinfectie van het blad gedurende zeven minuten was herisolatie van *Phoma* nog mogelijk. De inoculatie op 26 september liet sommige bladeren na 27 dagen nog zonder symptomen. De maximale dagtemperatuur was nu 11 tot 13 °C. Wel kon *Phoma* na spoelen uit de bladeren opnieuw worden geïsoleerd, maar niet meer na ontsmetten van het blad gedurende twee minuten. Waarschijnlijk was de schimmel latent op het bladoppervlak aanwezig gebleven, hetzij als sporen, hetzij als mycelium. Het is niet duidelijk of het lager worden van de temperatuur, dan wel het ouder worden van het blad hiervan de oorzaak was.

Tijdens de incubatietijd leeft *Phoma* dus in de fyllosfeer. Men kan aannemen, dat dit verblijf, afhankelijk van de omstandigheden, varieert van enkele dagen tot vele maanden.

BESPREKING

Zoals te verwachten was, staat de flora van het bieteblad sterk onder invloed van de omstandigheden. In overeenstemming met de resultaten door LAST verkregen, nam ook hier het aantal organismen toe met het ouder worden van het blad, met het stijgen van de luchtvochtigheid en van de temperatuur. Sterke fluctuaties traden echter op, zoals na regens, die de bladeren schoon spoelden. Waarschijnlijk zullen er binnen de perioden van drie weken, gelegen tussen de data van het onderzoek, nog vele andere niet geregistreerde schommelingen opgetreden zijn.

Verreweg de meeste der geïsoleerde organismen staan bekend als saprofyten, die uit de lucht of met opspattende aardedeeltjes op de bladeren terechtkomen. Het zijn ubiquisten, die zich op velerlei substraat thuis voelen en die zich ook met het exudaat van het bieteblad kunnen voeden. Om na te gaan inhoeverre er een affiniteit bestaat tussen de hier gevonden organismen en de biet, zou men de flora van bietebladeren uit een andere omgeving moeten kennen of de flora van een andere plantesoort uit dezelfde omgeving. Daarbij zouden ook de gisten en bacteriën betrokken dienen te worden.

Phoma betae heeft als parasiet een nauwe relatie tot het blad, evenals de biotrofe, vaak aanwezige *Uromyces betae*, waarvan de kiembuizen waarschijnlijk snel na de ontkieming het blad zullen binnendringen. *Phoma* kan daarentegen lang in de fyllosfeer aanwezig blijven, terwijl de saprofyten *Cladosporium*, *Alternaria* en misschien ook *Epicoccum* pas toegang tot het oudere of het reeds afgestorven blad verkrijgen. Ook *Cryptococcus albidus*, een pectine-hydroliserende gist, zal eerst na de dood van het blad de kans krijgen de celwanden aan te tasten.

In de ruimte, nauw grenzend aan de bladoppervlakte, waar de omstandigheden

door het metabolisme van het blad beïnvloed worden, de fyllosfeer, leven dus bij *Beta vulgaris* zowel zuiver saprofytische schimmels, zoals Penecillia, als andere, die op het ouder wordende blad tot een parasitische levenswijze overgaan en echte parasieten met een langere of kortere incubatietijd.

SAMENVATTING

De flora aanwezig op de oppervlakte van een bieteblad (ras Jaapjes Groenkraag) werd nagegaan. Uit het aantal geïsoleerde kolonies van bladstukjes van bekende afmeting, werd het aantal aanwezige schimmels, gisten en bacteriën per cm^2 blad berekend. Dit aantal bleek sterk afhankelijk van de weersomstandigheden, maar het nam in het algemeen toe met het stijgen van de temperatuur en de vochtigheid en met het ouder worden van het blad (fig. 1). De schimmelsoorten en enkele van de meest voorkomende gisten werden gedetermineerd (tabel 1). *Cladosporium herbarum* en *Alternaria tenuis* kwamen het meeste voor, vooral in het najaar. Deze schimmels vertoonden grote affiniteit tot het blad; *Phoma betae* kon zelfs het blad binnendringen na een kortere of langere incubatietijd (fig. 2 en 3). Deze flora leeft in de invloedssfeer van het blad, waarvoor de term „fyllosfeer" in de literatuur werd ingevoerd.

SUMMARY

Last (1955) recognized a flora mainly consisting in *Sporobolomyces roseus* Kluyver & van Niel on the leaves of wheat and barley, which he compared with the highly developed non-parasitic flora always occurring near to living roots. In analogy with the name "rhizosphere" used for the zone of influence of the root, he proposed "phyllosphere" for that of the leaf, where also a typical flora was found.

Ruinen (1956), who studied the epiphyllic population in the tropics, found a bacterium, *Beyerinckia* spec., occurring on the leaf surface of a great number of tropical plants species. Independently of Last, Ruinen also proposed the name "phyllosphere" for this characteristic milieu, the site of intense microbial activity. She emphasizes, however, the mutual relation between the microorganisms living in the phyllosphere and the leaf itself: the cuticular excretion of the leaf may serve as a nutrient medium and on the other hand the nitrogen, fixed by *Beyerinckia*, might be taken up by the leaf.

There is, however, more reason to compare the flora on the leaf surface with that on the surface of the root than with the flora in the rhizosphere, i.e. the zone near to the root as distinguished by Garrett (1956) and others. Among the organisms living on the root surface saprophytic fungi and others with a more or less parasitic character may be found. In analogy these types may also occur on leaves.

The following questions may be asked:

1. Which organisms can be detected on the leaf surface of a certain plant species?
2. Are they characteristic for this leaf or do they occur by chance?
3. What is the relation between these organisms and the leaf?

For a better understanding of these questions leaves of *Beta vulgaris* L. were chosen. Special stress was laid on the fungi occurring on the leaf surface. The

leaves were taken from a field, remote from houses, planted with fodder beets, variety Jaapjes Groenkraag, sown in the end of April 1957. On the following dates green leaves, all developed during May, were gathered and examined: May 21, June 11, July 2 and 24, August 18, September 8 and October 6, 1957. On November 2, 1956 the flora of 3 leaves, variety Klein Wanzleben was compared, i.e. an old green leaf, a yellowing and a wilted one. Whole leaves or pieces of them with a known surface were rinsed in a known volume of sterile water. Drops of this water were also plated on agar; pieces of the rinsed leaves were also plated out. The latter were cut up into smaller pieces of about 1 mm^2 before plating. From the total number of colonies which developed, the number of fungi, yeasts and bacteria per cm^2 leaf surface were calculated (fig. 1).

There appeared to be a correlation between the numbers of organisms present on the leaf surface and the environmental conditions. The pouring rain on the 11th of June, just before the leaves were picked, had cleaned the leaves before their arrival in the laboratory. During August the total number of organisms increased, probably in consequence of the increasing relative humidity. The numbers decreased with the lowering of the temperature during September. During the first 10-day period of October the humidity was exceptionally high with a daily rainfall over 0.1 mm but less than 1 mm, which may explain another increase. However, fluctuations in the number of organisms must have been considerable, far higher than could be stated by a 3-weekly survey.

Most of the fungi identified, approximately 34 species appeared to belong to the soil inhabitants or they were known ubiquists, also occurring in the air. The fungal flora on the leaf may depend largely on spores, blown on to the surface by chance or splashed up by rain.

The only parasite present was *Phoma betae* (OUD.) FRANK (table 1). The relation of this fungus to the leaf blade was studied: inoculations with a spore suspension resulted in small necrotic flecks on the leaves. In August, when the maximum temperature was about 20 °C, they enlarged to big leaf spots with concentric rings and pycnidia (fig. 2 and 3). This stage was reached after 12 days. In September the incubation period was much longer. In October, when the maximum temperature had lowered to 11° to 13 °C, the fungus was still present on the leaf after 27 days without having entered it. It still belonged to the surface flora. Older leaves and especially wilted ones showed a greater number of organisms on the surface than younger ones. Moreover a higher percentage of the total number of fungi present could not be washed off by rinsing of the leaves at the end of the season. Also the mycelium of *Cladosporium herbarum* LINK and that of *Alternaria tenuis* NEERGAARD seemed to be narrowly connected with the epidermis. The latter may even have penetrated into the leaf, as after seven minutes of surface sterilisation with mercurichloride 0.1 % this fungus could still be isolated. The saprophytic fungi, such as *Cladosporium* and *Epicoccum* may play a role in destroying the leaf after its death.

After counting the colonies, no further attention was paid to the groups of yeasts and bacteria. From the yeasts only a few isolates were identified, as most colonies seemed the same. *Sporobolomyces roseus*, found by LAST on wheat leaves, was also frequent on those of beet. *Cryptococcus albidus*, a pectin-hydrolyzing yeast, may destroy the cell walls of the dead leaves. From the fungal flora it could not be stated, if among the species were typical phyllosphere inhabitants of *Beta vulgaris*. To answer this question it would be necessary to analyse the

flora on *Beta*-leaves originating from another site or to analyse the epiphyllic flora of another plant species in the same environment. Only the relation of *Phoma betae* to the leaf seemed more clear: a shorter or longer time after germination it became instead of an epiphyllic fungus a parasitic one.

The term "phyllosphere" may be used for that site of the leaf surface, where environmental conditions are largely determined by the leaf. The inhabitants may display a saprophytic or a more parasitic character. They may be more or less specific and more or less able to multiply on the leaf.

LITERATUUR

Brown, W., – 1922. Studies in the physiology of parasitism VIII. On the exosmosis of nutrient substances from the host tissue into the infection drop. Ann. Bot. 36; 101–119.

Derx, H. G., – 1950. Beyerinckia, a new genus of nitrogen-fixing bacteria occurring in tropical soils. Proc. kon. Ned. Akad. Wetensch. 53: 1–10.

Kovacs, A. & E. Szeöke, – 1956. Die phytopathologische Bedeutung der kutikulären Exkretion. Phytopath. Z. 27: 335–349.

Last, F. T., – 1955. Seasonal incidence of Sporobolomyces on cereal leaves. Trans. Brit. mycol. Soc. 38: 221–239.

Mes, M. G., – 1953. Excretion of fosfor and other mineral elements by leaves under the influence of rain. S. Afr. J. Sci. 50: 167–172.

Rishbeth, J. & D. S. Meredith, – 1957. Surface microflora of pine needles. Nature 179: 682.

Ruinen, J., – 1956. Occurrence of Beyerinckia species in the "phyllosphere". Nature 177: 220–221.

Will, G. M., – 1955. Removal of mineral nutrients from tree crowns by rain. Nature 176: 1180.

DRUK: H. VEENMAN EN ZONEN, N.V. WAGENINGEN